

A95 Peptidstørrelsesfordeling – Validering ny kolonne

Tor-Arne Krakeli





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 390 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1433 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

<i>Tittel:</i> A 95 Peptidstørrelsesfordeling – Validering ny kolonne	ISBN 978-82-8296-699-3 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Title:</i> A 95 Molecular Weight Distribution – Validation of the new column	<i>Rapportnr.:</i> 36/2021
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Tor-Arne Krakeli	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Avdeling:</i> BioLab	<i>Dato:</i> 26.10.2021
<i>Oppdragsgiver:</i> Nofima AS - Bergen	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 13+6
<i>Stikkord:</i> SEC, Size Exclusion Chromatography, Peptider	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> 11277
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> <p>For analysen 'A 95 peptidstørrelsesfordeling' benytter BioLab Size Exclusion Chromatography (SEC) kolonnen Superdex Peptide. Ved ønske om å kjøpe inn en ny kolonne av den samme typen ble det oppdaget at denne var tatt ut av produksjon. Fra leverandøren sin side var det anbefalt en kolonne som avtager, Superdex Increase.</p> <p>Etter en validering der de to kolonnene ble sammenlignet ble det konkludert med at kolonnen Superdex Increase kunne brukes som en avtager for Superdex Peptide. Dette medførte derimot en noe større måleusikkerhet, og en innskrenkning i måleområdet fra '<200 – 20 000<' til '<200 – 15 000<'.</p>	
<i>English summary/recommendation:</i> <p>In the analysis 'A 95 Molweight Distribution of Peptides' BioLab use the Size Exclusion Chromatography (SEC) column Superdex Peptide. After a request for a new column of the same type it was informed that the column was no longer produced. The supplier recommended a replacement column, Superdex Increase.</p> <p>After a validation where the two columns was compared, it was concluded that BioLab could use Superdex Increase as a replacement for Superdex Peptide. This lead to a slight increase in the uncertainty for the metode, and a restriction in the measuring area. From '<200 – 20 000<' to '<200 – 15 000<'.</p>	

Innhold

1	Formål	1
2	Teori	2
2.1	Presisjon	2
2.2	Måleusikkerhet.....	2
3	Eksperimentelt.....	4
3.1	Kjemikalier, reagenser og prøvemateriale	4
3.2	Instrumentering.....	4
4	Resultater	5
4.1	Dokumentsammenligning mellom Superdex Peptide 10/300 og Superdex 30 Increase 10/300	5
4.2	Linearitet	6
4.3	Reproduserbarhet	8
4.4	Måleusikkerhet.....	9
4.5	Repeterbarhet	11
5	Konklusjon	12
6	Referanser	13

Vedlegg

1 Formål

For analysen 'A 95 peptidstørrelsesfordeling' benytter BioLab Size Exclusion Chromatography (SEC) kolonnen Superdex Peptide. Ved ønske om å kjøpe inn en ny kolonne av den samme typen ble det oppdaget at denne var tatt ut av produksjon. Fra leverandøren sin side var det anbefalt en kolonne som avtaker, Superdex Increase. Før denne tas i bruk må det utføres en validering der de to kolonnen sammenlignes. Se vedlagt valideringsplan (se vedlegg 1).

2 Teori

2.1 Presisjon

Presisjon er definert som 'graden av overenstemmelse mellom uavhengige analyseresultater framkommet under spesifikke forhold' (NMKL, 2009). Begrepet må ikke forveksles med riktighet. Presisjonen uttrykkes vanligvis som standardavviket til analyseresultatet. Det er to måter å bestemme presisjonen på:

- **Repeterbarhet:** Resultatene er framskaffet av å analysere den samme prøven, med det samme utstyret og innenfor et relativt kort tidsrom.
- **Reproduserbarhet:** Resultatene er framskaffet ved å analysere den samme prøven og den samme metoden, men på ulike laboratorier.

Repeterbarheten uttrykkes ofte som repeterbarhetsgrensen (r), som er et uttrykk for den absolutte differansen mellom to uavhengige analyser med et konfidensintervall oppnådd med like betingelser (ISO, 1994 a). Slike beregninger kalles dobbeltbestemmelser (NMKL, 2009). r beregnes som vist i formell 2.1:

$$r = f \sqrt{2} s \quad (2.1)$$

f er den kritiske utvalgsfaktoren som er avhengig av valg av konfidensintervall. s er standardavviket til repeterbarheten (ISO, 1994 b), og beregnes som vist i formel 2.2:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{2n}} \quad (2.2)$$

x_i og y_i er de to målingene fra dobbeltbestemmelsen, og n er antall par av dobbeltbestemmelser (NMKL, 2009). Vanligvis antas det en normal distribusjon og et konfidensintervall på 95 %, som gir en verdi $f = 1,96$. r beregnes da som vist i formel 2.3:

$$r = 2,8 s \quad (2.3)$$

Reproduserbarheten kan uttrykkes som standardavviket ved enkeltbestemmelser. Dette er et estimat for spredning rundt gjennomsnittet, i motsetning til dobbeltbestemmelse som ser på den gjennomsnittlige variasjonen mellom differansen til to enkeltmålinger.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.4)$$

\bar{x} er et gjennomsnitt av alle enkeltmålingene:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.5)$$

2.2 Måleusikkerhet

Den totale måleusikkerheten beregnes som kombinert måleusikkerhet (U_c) av den erfarte spredningen med repeterte analyser og differansen mellom interne og eksterne resultater ($U_{Erfart-Teoretisk}$). Det

benyttes en dekningsfaktor på 2, som tilsvarer et 95 % konfidensintervall. Beregningene følger formel 2.5:

$$U_C = k * \sqrt{U_{LAB}^2 + U_{Erfart-Teoretisk}^2} \quad (2.5)$$

U_{LAB} er Nofima Biolab sitt interne standardavvik for repeterbarhet, og tilsvarer s i formel 2.2. Verdien bestemmes ut ifra differansen mellom dobbeltbestemmelser i prøvematerialer med resultater i normalområdet.

$U_{Erfart-Teoretisk}$ er standardavviket mellom snittresultatene fra Nofima Biolab og den teoretiske verdien til standardene.

3 Eksperimentelt

Den benyttede metodikken er etablert gjennom BioLab sin analysemetode 'A 95 Peptidstørrelsesfordeling'. Denne metoden er basert på utviklingsarbeid utført under rapporten 'Forbedret analyse-metodikk for peptidstørrelsesfordeling i marine proteinhydrolysater' (Rubin rapport 200).

3.1 Kjemikalier, reagenser og prøvemateriale

Syntetisk peptidstandard ("Alberta, A1 til A5") frysetørket har tidligere blitt anskaffet fra Alberta Peptide Institute (Departement of Biochemistry, University of Alberta). De resterende peptidstandarder ble kjøpt fra Sigma-Aldrich: Blue Dextran, Bovine Albumin, Carbonic Anhydrase, Lysozyme, Cytochrome C, Aprotinin, Insulin from Bovine Pancrease, Polymyxin, Substrat P, (Leu)₃ Gly, Gastrin I.

Metanol, acetonitril og trifluoreddiksyre var av HPLC-kvalitet og vannet var renset til HPLC kvalitet.

3.2 Instrumentering

Analysene ble utført på en Agilent 1260 Kvaternær LC med UV-detektor. De benyttede Size Exclusion Chromatography (SEC) kolonnene i denne valideringen var en Superdex 30 Increase 10/300 GL og en Superdex Peptide 10/300 GL. Begge kolonnene er produsert av GE Healthcare Bio-Sciences AB.

4 Resultater

4.1 Dokumentsammenligning mellom Superdex Peptide 10/300 og Superdex 30 Increase 10/300

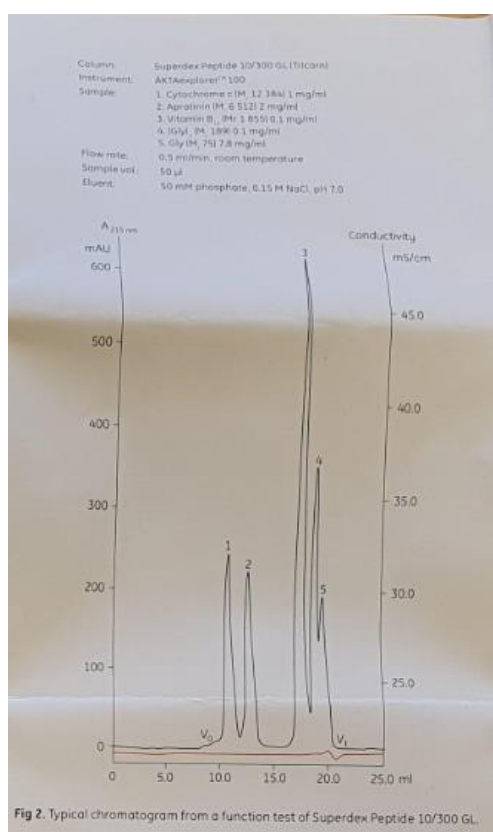
Ved forespørsel til leverandøren (Sigma-Aldrich/Merck) har det blitt opplyst om at kolonneprodusenten GE Healthcare tok kolonnen Superdex Peptide ut av produksjon høsten 2017. Denne ble samtidig erstattet av kolonnen Superdex 30 Increase.

En sammenligning av spesifikasjonene mellom kolonnene vises i Tabell 1.

Tabell 1 Spesifikasjoner Superdex Peptide og Superdex 30 Increase.

	Superdex Peptide	Superdex 30 Increase
Dødvolum [mL]	24	24
Stasjonærfase	Kryssbundet agarose og dextrans	Kryssbundet agarose og dextrans
Makstrykk [bar]	18	50

I den oppgitte dokumentasjonen til begge kolonnene er det utført en separasjon av tilsvarende 5 stk standarder, men med noen små forskjeller i elueringsbetingelser. Se i Figur 1 og Figur 2.



Figur 1 Kromatogram for standarder eluert i følgende rekkefølge Cytochrome C, Aprotinin, Vitamin B12, Triglycine, Glycine. Kolonne Superdex Peptide.

Sample: 1. Cytochrome C (M, 12 400) 0.2 mg/mL
2. Aprotinin (M, 6500) 0.2 mg/mL
3. Vitamin B12 (M, 1355) 0.07 mg/mL
4. Triglycine (M, 189) 0.2 mg/mL
5. Glycine (M, 75) 7 mg/mL
The proteins/peptides were diluted in 2xPBS

System ÄKTA pure 25
Sample volume: 100 µL
Eluent: 2xPBS (0.02 M phosphate buffer, 0.28 M NaCl,
0.006 M KCl, pH 7.4)
Flow rate: 0.8 mL/min, room temperature
Detection: 214 nm

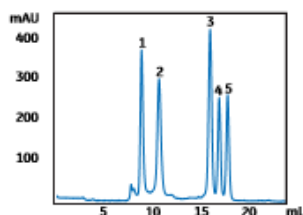


Fig 3. Typical chromatogram from a function test of Superdex 30 Increase 10/300 GL.

Figur 2 Kromatogram for standarder eluert i følgende rekkefølge Cytochrome C, Aprotinin, Vitamin B12, Triglycine, Glycine. Kolonne Superdex 3 Increase.

Disse kromatogrammene er utført under tilnærmet like betingelser, men med noen mindre endringer i eluentsammensetningen. Elueringstiden for Superdex Peptide er noe lengre, men dette antas og skyldes lavere flowrate i spesifikasjonene. Elueringsrekkefølgen på standardene er like.

Basert på disse sammenligningene av spesifikasjonene antas det at den anbefalte kolonnen Superdex 30 Increase fra produsenten vil gi tilsvarende separasjon som ved Superdex Peptide.

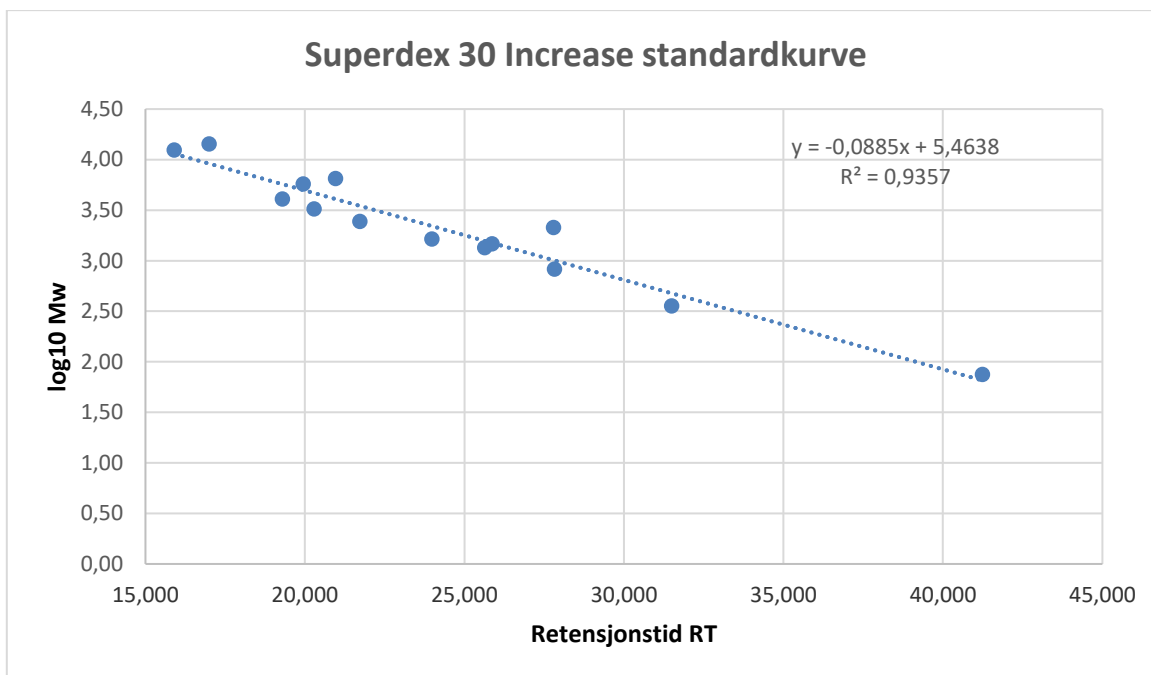
4.2 Linearitet

Kolonnen Superdex Increase ble testet ut med tilsvarende standarder som har blitt benyttet i valideringen og i standardkurven til kolonnen Superdex Peptide (Rubin rapport 200). Oversikten over standardene og retensjonstidene er oppgitt i

Tabell 2 Oversikt standarder benyttet i validering av Superdex Increase.

Standard	Mw	log10 Mw	RT
Blue Dextran	2000000	6,30	24,15
Biovine Albumin	66000	4,82	14,77
Carbonic Anhydrase	29000	4,46	14,85
Alberta 5	4057,22	3,61	19,30
Lysozyme	14300	4,16	16,99
Cyt C	12400	4,09	15,91
Aprotinin	6500	3,81	20,96
Insilun from Biovine Pancrease	5733,49	3,76	19,94
Alberta 4	3249,38	3,51	20,28
Alberta 3	2441,54	3,39	21,72
Alberta 2	1633,7	3,21	23,98
Polymyxin	1470	3,17	25,86
Substrat P	1347,63	3,13	25,64
Alberta 1	825,86	2,92	27,83
(Leu)3	357,49	2,55	31,50
Gly	75,07	1,88	41,25
Gastrin I	2126,28	3,33	27,79

Av disse standardene kan det kommenteres at Blue Dextran, Biovine Albumin og Carbonic Anhydrase ble utelukket på grunn av størrelsen. Blue dextran hadde en lang retensjonstid som skilte seg ut, men dette antas å skyldes nedbrytning av produktet i løsning. Carbonic anhydrase har tidligere vært en del av standardkurven til kolonnen Superdex Peptid, men på grunn av økt måleusikkerhet og dårligere linearitet (R-kvadrat) i forhold til Superdex Peptid ble den valgt vekk. Standardkurven med tilhørende linearitet (R-kvadrat) er plottet i Figur 3.



Figur 3 Standardkurve for Superdex Increase.

Det ble analysert 2 stk standardkurver med tre stk replikater for hver standard. Se vedlegg 2 og vedlegg 3. Begge gav tilsvarende resultat i forhold til linearitet.

Sammenlignet med standardkurven til Superdex peptid (Rubin rapport 200) der R-kvadrat er 0,9637 så er lineariteten noe dårligere.

4.3 Reproduserbarhet

I analysemetoden blir resultatene utgitt som prosentfordeling innenfor de ulike molekylvektsintervallene. Både Superdex Peptid og Superdex Increase kolonnene er fra leverandøren sin side begrenset til et område mellom 100 – 7000 MW. Selv om dette er de oppgitte spesifikasjonene betyr det ikke nødvendigvis at lineariteten er dårligere utover disse grensen, og kvantifisering av andeler i større molekylvektsområder kan være vel så riktig. Dette har vist seg å stemme med den tidligere kolonnen Superdex Peptid (Rubin rapport 200) og er sammenlignbart med denne kolonnen. Reproduserbarheten for ulike standarder i hele kolonnens måleområde er vist i tabell 2.

Tabell 3 Retensjonstid og reproduserbarhet for standarder.

Standard	Mw	log10 Mw	Snitt RT	Std RT	RSD	n
Blue Dextran	2000000	6,3	19,6	5,10	26,1	6
Biovine Albumin	66000	4,8	14,8	0,05	0,3	6
Carbonic Anhydrase	29000	4,5	14,9	0,03	0,2	6
Alberta 5	4057,22	3,6	19,1	0,20	1,1	6
Lysozyme	14300	4,2	17,1	0,07	0,4	6
Cyt C	12400	4,1	15,9	0,06	0,4	6
Aprotinin	6500	3,8	21,6	0,73	3,4	6
Insulin from Bovine Pancrease	5733,49	3,8	19,9	0,04	0,2	6
Alberta 4	3249,38	3,5	20,1	0,21	1,0	6
Alberta 3	2441,54	3,4	21,5	0,21	1,0	6
Alberta 2	1633,7	3,2	23,8	0,20	0,8	6
Polymyxin	1470	3,2	26,1	0,25	0,9	6
Substrat P	1347,63	3,1	25,6	0,01	0,0	6
Alberta 1	825,86	2,9	27,7	0,17	0,6	6
(Leu)3	357,49	2,6	31,4	0,10	0,3	6
Gly	75,07	1,9	41,6	0,43	1,0	6
Gastrin I	2126,28	3,3	27,9	0,15	0,5	6

For de to standardene Blue Dextran og Aprotinin observeres det en noe større spredning i resultatene. Som tidligere nevnt antas det at spredningen for Blue Dextran skyldes en nedbrytning av produktet. Hva som er årsaken for Aprotinin er uvisst, men siden dette ikke omfatter de resterende standardene regnes dette som et enkeltstående tilfelle.

4.4 Måleusikkerhet

Måleusikkerheten for metoden vil være den kombinerte måleusikkerheten U_c som består av den erfarte målingen ved repeterte målinger U_{LAB} og de forskjellene mellom de faktiske og målte verdier av molekylvekt $U_{Erfart-Teoretisk}$. Se formel 2.5. Den gjennomsnittlige måleusikkerheten ved repeterte målinger av reelle prøver er ved BioLab tidligere oppgitt til å være U_{LAB} 1 %. Se tabell 4.

Tabell 4 Kombinert måleusikkerhet for metoden.

Prøve nr.	Beregnet MW	Oppgitt MW	Diff.	Diff ²	Snitt	Antall
Alberta 5	5711	4057	1654	2736224	4884	1
Lysozyme	9136	14300	-5164	26665937	11718	3
Cyt C	11396	12400	-1004	1007097	11898	4
Aprotinin	4075	6500	-2425	5881783	5287	5
Insilun from Biovine Pancrease	5006	5733	-727	528979	5370	6
Alberta 4	4671	3249	1422	2021614	3960	7
Alberta 3	3488	2442	1046	1094594	2965	8
Alberta 2	2201	1634	568	322205	1918	9
Polymyxin	1500	1470	30	886	1485	10
Substrat P	1571	1348	223	49781	1459	11
Alberta 1	1005	826	179	32119	915	12
(Leu)3	476	357	119	14083	417	13
Gly	65	75	-10	94	70	14
Gastrin I	1012	2126	-1114	1241479	1569	15
n=	15	SUM D²=	41596876,664	Snitt=	3851,14	

Repeterbarhet			
Gjennomsnitt:		3851,14	Sr = ROT(SUM(D*D)/2K) 1177,524
Erfart-Teoretisk %CV _{Sr} =		30,58	r = 2,8 * Sr 3330,541
LAB %CV _{Sr} =		1,00	
u(Erf-Teoretisk)		1177,52	
u(LAB)		38,51	
u _c		1178,15	
%RSD		31	

For kolonnen Superdex Peptid er denne måleusikkerheten oppgitt til å være 21 % (RUBIN rapport 200), men da også for et noe større måleområde. Dette understreker en større variasjon i kolonnen Superdex Increase sammenlignet med den tidligere kolonnen Superdex Peptid.

Standarden Carbonic Anhydrase ble valgt vekk fra standardkurven på grunn av at dette ville gi en ytterligere økning i måleusikkerheten. Ved Superdex Peptid har det høyeste molekylvektsintervallet vært >20 000 MW. På grunn av fjerningen av Carbonic Anhydrase blir det høyeste intervallet nå >15 000 MW. Se Tabell 5.

Tabell 5 MW område for Superdex Increase. Rådata basert på standardkurven fra figur 3.

Mw-Peptid	log10 Mw	RT fra	RT til	Tilsvarende Mw-intervall
15 000	4,18	1,000	14,557	>15 000
10 000	4,00	14,557	16,548	15 000 - 10 000
8 000	3,90	16,548	17,643	10 000 - 8 000
6 000	3,78	17,643	19,056	8 000 - 6 000
4 000	3,60	19,056	21,046	6 000 - 4 000
2 000	3,30	21,046	24,449	4 000 - 2 000
1 000	3,00	24,449	27,852	2 000 - 1 000
500	2,70	27,852	31,255	1 000 - 500
200	2,30	31,255	35,754	500 - 200
Forbindelser under 200		35,754	60,000	<200

4.5 Repeterbarhet

Analysemetoden A 95 Peptidfordeling er ikke med i noen kollaborativ metodeutprøving (SLP) eller tilsvarende. Standarder blir fra før brukt som enkeltpunkter til å lage en standardkurve, men metoden er ikke ment for å kunne identifisere enkeltforbindelser. Fra før har metoden brukt en fiskeensilasje (2012-3324-01) som kontrollprøve ved hver analyseserie. Det er ikke laget noe formelt kontrollkort for denne prøven, men fordelingen i de ulike molekylveksintervallene blir vurdert for hver gang. Denne kontrollprøven ble analysert i 10 stk replikater ved kolonnen Superdex Increase. Det var små differanser mellom de 10 stk replikatene. Snittet ble brukt til å sammenligne mot snittet av de 10 stk siste kontrollprøvene fra kolonnen Superdex Peptid. Se Tabell 6. For rådata se vedlegg 4.

Tabell 6 Sammenligning kontrollprøve mellom kolonnene Superdex Increase og Superdex Peptid.

MW	Superdex Increase - Snitt	Std	Superdex Peptide	Std	Differanse Increase - Peptide
>20 000			0,3	0,1	
20 000 - 15 000	0,2	0,0	0,4	0,1	-0,5
15 000 - 10 000	3,0	0,0	1,0	0,1	2,0
10 000 - 8 000	3,1	0,0	1,1	0,0	2,0
8 000 - 6 000	5,6	0,0	2,4	0,1	3,2
6 000 - 4 000	8,4	0,0	5,4	0,1	3,0
4 000 - 2 000	14,2	0,0	14,2	0,2	0,0
2 000 - 1 000	13,5	0,0	16,2	0,2	-2,8
1 000 - 500	12,0	0,0	14,1	0,1	-2,1
500 - 200	14,2	0,0	15,6	0,2	-1,4
<200	25,8	0,1	29,2	0,8	-3,5

Dette er to forskjellige kolonner og det er forventet at det vil være noen systematiske forskjeller. Disse systematiske forskjellene er derimot innenfor den beregnede måleusikkerheten. Så selv om det vil være noen små forskjeller mellom de to kolonnene ser det ut til at Superdex Increase vil kunne gi god repeterbarhet.

5 Konklusjon

Kolonnen Superdex Increase er oppgitt av leverandøren GE Healthcare som en avtager for kolonnen Superdex Peptid. De to kolonnene er relativt like når det gjelder oppgitte spesifikasjoner, og det ble også forventet å være relativt like mhp linearitet, reproduserbarhet, repeterbarhet og måleusikkerhet.

Lineariteten var noe dårligere sammenlignet med Superdex Peptid.

Reproduserbarheten av standarder var likt det som var forventet fra Superdex Peptid.

Repeterbarheten ved gjentagende analyse av kontrollprøven var bedre enn ved Superdex peptid. Men ved sammenligningen så var Superdex Peptid resultatene gjort på bakgrunn av analyser som var utført over en lengre tidsperiode, mens Superdex Increase var utført over en analyseserie med mange gjentatte analyser.

Måleusikkerheten for Superdex Increase er på 31 % og er høyere enn for Superdex peptid. Samtidig er måleområdet begrenset til $<200 - 15\ 000 <$.

På bakgrunn av valideringen som er utført godkjennes kolonnen Superdex Increase som avtager til kolonnen Superdex Peptid i analysemetoden BIOLAB A 95 Peptidstørrelsesfordeling.

6 Referanser

- NMKL-Prosedyre NR.4, "Validering av kjemiske analysemetoder", NMKL (Nordisk metodikkommittè for næringsmidler), (2009), 46 s.
- Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions (5725-1), ISO (1994 a), International Organization for Standardization, 17 s.
- Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 6: Use in practice of accuracy values (5725-6), International Organization for Standardization, ISO (1994 b), 41 s.
- J. Wang-Andersen, B.O. Haugsgjerd, 'Forbedret analyse-metodikk for peptidstørrelsesfordeling i marine proteinhydrolysater', 2011, Rubin rapport 200.

Vedlegg 1 Valideringsplan

	Analysemetode:	Peptidstørrelsesfordeling		
	Metode nr.:	A95		
	Metodeansvarlig:	Tor-Arne Krakeli		
	Metodereferanse:	J. Wang-Andersen, B.O. Haugsgjerd, 2011, Rubin rapport, 'Forbedret analyse-metodikk for peptidstørrelsesfordeling i marine proteinhydrolysater'.		
Trinn				
1	Grad av tidligere ekstern validering:	Ikke validert eksternt, men det har vært en sammenligning mellom alternative kolonner i oppgitt referanse.		
2	Valideringsomfang:	En sammenligning mellom den nye kolonnen 'Superdex 30 Increase 10/300' og den gamle 'Superdex Peptide 10/300'.		
3	Avvik fra metodereferanse:	Forskjellen fra metodereferansen er anskaffelsen av en ny kolonne. Fra leverandøren (Sigma Aldrich) er dette oppgitt som erstatning for den opprinnelige kolonnen.		
Punkt	Valideringspunkter	Aktivitet og krav	Utføres av:	Tidsplan:
1	Dokument sammenligning mellom ny/gammel kolonne	Dokumentgransking for å kontrollere at kolonnene har relativt like egenskaper.	TOKR	Uke 12
2	Linearitet	Lage til en kalibreringskurve ved Superdex 30 Increase ved å bruke tilsvarende standarder som benyttet ved eksisterende metodikk. Etablerte elueringsbetingelser benyttes. Sammenligne det lineære området og vurder.	TOKR/BA	38
2	Reproduserbarhet og måleusikkerhet	Basert på de analyserte standardene i valideringen gjøres det en vurdering av reproduserbarheten sammenlignet mot metodereferansen. Beregne måleusikkerhet ut ifra de analyserte standardene gjort	TOKR/BA	38

		under valideringen og sammenligne med måleusikkerheten fra metodereferansen.		
3	Repeterbarhet og sammenligning med intern kontrollprøve	Den etablerte kontrollprøven 12-3324-01 skal analyseres 10 stk påfølgende ganger. Resultatet skal vurderes i forhold til samlede data i etablert metode. Repeterbarheten kan kun sammenlignes mot reproduserbarheten til samlede data for kontrollprøven.	TOKR/BA	39

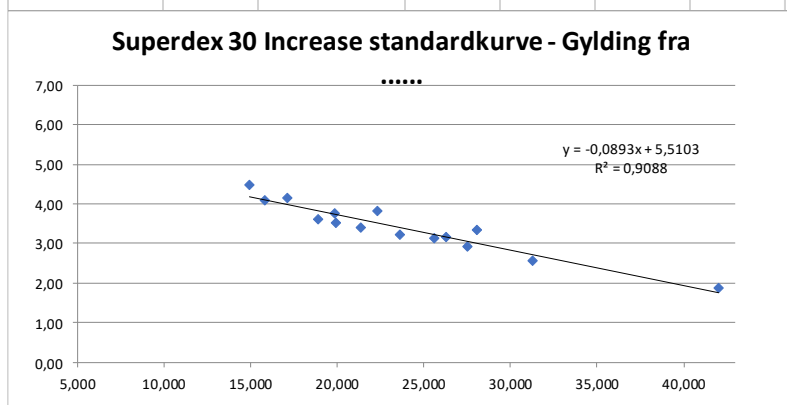
Skal leses av	Initialer	Dato	Signatur
Kvalitetsleder:			
Leder A-lab.:	JWA	8/10-21	

Vedlegg 2 Rådata for standardkurve analysert oktober 2020

Standard	mg/mL	Beregnet (fra graf)	Mw	log10 Mw	RT1	RT2	RT3	Snitt RT	SD	RSD% RT	n =
Blue Dextran	2,58	14907,08	2000000	6,30	14,93	15,008	14,952	14,963	0,040	0,269	3
Biovine Albumin	3,33	15246,17	66000	4,82	14,882	14,84	14,84	14,854	0,024	0,163	3
Carbonic Anhydrase	2,35	15111,90	29000	4,46	14,893	14,898	14,9	14,897	0,004	0,024	3
Alberta 5	2,70	6600,25	4057,22	3,61	18,923	18,922	18,926	18,924	0,002	0,011	3
Lysozyme	3,88	9575,33	14300	4,16	17,125	17,112	17,108	17,115	0,009	0,052	3
Cyt C	1,70	12543,91	12400	4,09	15,805	15,8	15,802	15,802	0,003	0,016	3
Aprotinin	2,63	3302,84	6500	3,81	22,3	22,307	22,26	22,289	0,025	0,114	3
Insilun from Biovine	3,23	5437,48	5733,49	3,76	19,857	19,865	19,875	19,866	0,009	0,045	3
Alberta 4	2,70	5395,14	3249,38	3,51	19,902	19,902	19,907	19,904	0,003	0,015	3
Alberta 3	2,70	4018,48	2441,54	3,39	21,332	21,335	21,34	21,336	0,004	0,019	3
Alberta 2	2,70	2516,37	1633,7	3,21	23,608	23,61	23,615	23,611	0,004	0,015	3
Polymyxin	3,23	1443,33	1470	3,17	26,308	26,313	26,318	26,313	0,005	0,019	3
Substrat P	0,27	1664,49	1347,63	3,13	25,617	25,62	25,623	25,620	0,003	0,012	3
Alberta 1	2,70	1127,06	825,86	2,92	27,513	27,515	27,518	27,515	0,003	0,009	3
(Leu)3	3,40	516,70	357,49	2,55	31,302	31,307	31,31	31,306	0,004	0,013	3
Gly		56,97	75,07	1,88	42,025	42,027	42,02	42,024	0,004	0,009	3
Gastrin I	0,20	1005,52	2126,28	3,33	28,068	28,077	28,065	28,070	0,006	0,022	3

Kommentar:

Alle standardene er fortynnet i eluenten knyttet til metoden (70% Acetonitril), med unntak av Gastrin I og (Leu)3. Gastrin I og (Leu)3 er løst i en vann med 0,1% NaOH. Blue dextran og Biovine Albumin er tatt vekk siden de er relativt store molekyler, og de avviker fra lineariteten i grafen. Gastrin har to toppe i kromatogrammet sitt. Den største toppen ble valgt, men selv den ga noe avvik i forhold til forventet linearitet. For sikkerhetsskyld utelates det punktet.



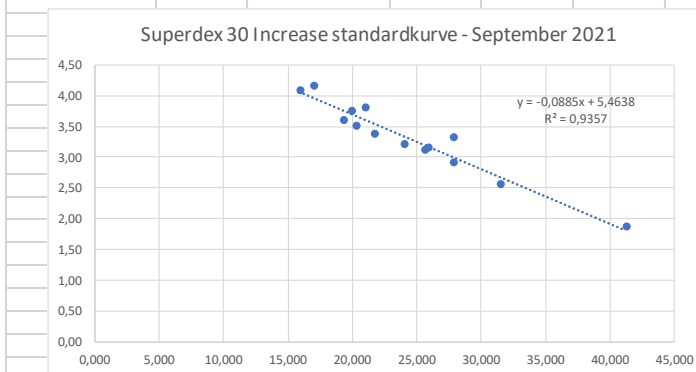
a -0,08934409
b 5,51027784

Vedlegg 3 Rådata for standardkurve analysert september 2021

Standard	mg/mL	Beregnet (fra graf)	Mw	log10 Mw	RT1	RT2	RT3	Snitt RT	SD	RSD% RT	n =
Blue Dextran	2,58	2124,25	2000000	6,30	24,933	24,826	22,701	24,153	1,259	5,212	3
Biovine Albumin	3,33	14358,66	66000	4,82	14,758	14,782	14,775	14,772	0,012	0,084	3
Carbonic Anhydrase	2,35	14127,54	29000	4,46	14,852	14,85	14,852	14,851	0,001	0,008	3
Alberta 5	2,70	5711,37	4057,22	3,61	19,293	19,3	19,3	19,298	0,004	0,021	3
Lysozyme	3,88	9136,09	14300	4,16	16,992	16,99	16,992	16,991	0,001	0,007	3
Cyt C	1,70	11396,46	12400	4,09	15,918	15,902	15,898	15,906	0,011	0,067	3
Aprotinin	2,63	4074,76	6500	3,81	20,953	20,958	20,955	20,955	0,003	0,012	3
Insulin from Biovine	3,23	5006,18	5733,49	3,76	19,945	19,947	19,942	19,945	0,003	0,013	3
Alberta 4	2,70	4671,21	3249,38	3,51	20,282	20,285	20,287	20,285	0,003	0,012	3
Alberta 3	2,70	3487,77	2441,54	3,39	21,712	21,723	21,722	21,719	0,006	0,028	3
Alberta 2	2,70	2201,33	1633,7	3,21	23,973	23,982	23,98	23,978	0,005	0,020	3
Polymyxin	3,23	1499,77	1470	3,17	25,865	25,86	25,862	25,862	0,003	0,010	3
Substrat P	0,27	1570,75	1347,63	3,13	25,632	25,637	25,637	25,635	0,003	0,011	3
Alberta 1	2,70	1005,08	825,86	2,92	27,822	27,832	27,828	27,827	0,005	0,018	3
(Leu)3	3,40	476,16	357,49	2,55	31,493	31,497	31,495	31,495	0,002	0,006	3
Gly		65,35	75,07	1,88	41,227	41,225	41,283	41,245	0,033	0,080	3
Gastrin I	0,20	1012,06	2126,28	3,33	27,777	27,801	27,802	27,793	0,014	0,051	3

Kommentar:

Alle standardene er fortennet i eluenten knyttet til metoden (30% Acetonitril), med unntak av Gastrin I og (Leu)3. Gastrin I og (Leu)3 er løst i en vann med 0,1% NaOH. Blue dextran og Biovine Albumin er tatt vekk siden de er relativt store molekyler, og de avviker fra lineariteten i grafen. Gastrin har to toppar i kromatogrammet sitt. Den største toppen ble valgt, men selv den ga noe avvik i forhold til forventet linearitet. For sikkerhetsskyld utelates det punktet.



a -0,08846073
b 5,46382626

Vedlegg 4 Sammenligning snitt 10 stk kontrollprøver analysert på Superdex Increase mot 10 stk tidligere analyser på Superdex Peptide

Superdex Peptid	MW - Areal	>20 000	20 000 - 15 000	15 000 - 10 000	10 000 - 8 000	8 000 - 6 000	6 000 - 4 000	4 000 - 2 000	2 000 - 1 000	1 000 - 500	500 - 200	<200
26.07.2021	10139265	18710533	56578364	60692577	133559877	303568886	793716567	909042144	789787207	876824340	1633742298	
23.08.2021	2376309	8941873	48102125	62437702	142285384	327842248	860142883	994420526	876718264	927719550	1934986475	
28.08.2021	25563719	26436726	66295796	68580054	150301255	341897329	891142500	1012492011	876058136	972034197	1810637479	
01.09.2021	23762090	26149819	66307223	68731169	151101326	344822153	900322193	1022988701	884512298	980874673	1824010742	
09.09.2021	11472312	20799652	63958642	67507921	150089427	350383518	922787957	1048685359	900640896	995640321	1837459133	
09.09.2021	24470976	26167453	64988113	66813472	148676110	347780823	920707213	1054329274	908356490	1000972700	18442290449	
17.09.2021	31245552	27424919	70168837	74001929	160776425	358634409	936442543	1072423361	942195750	1055000658	1941121902	
24.09.2021	30864302	28417331	73199948	76703817	165877273	369869396	959047225	1083841586	942386235	1057229292	19366972008	
24.09.2021	31863163	28217010	71984831	75315859	163693660	367545591	958611476	1090063479	949713173	1062806473	19472593980	
Superdex Increase												
28.09.2021												
(Nye grenser RT)												
	9516617	158889210	164035041	295398456	448031738	751828881	709785417	631332079	746999599	1360164788		
	10553041	155205918	163835863	296164367	447436329	753753395	711177706	632665228	748428460	1362887524		
	9661585	160674472	164067324	295475213	446033106	751984726	710237511	631550212	746660869	1361373404		
	9758087	161854979	164257172	295098413	445445206	751249403	709691503	631180866	749459525	1354425824		
	11302359	161587221	164851807	295254719	444791985	750979911	710057413	631983086	751161052	1350898414		
	10246241	157831861	160384877	288870473	434462291	733382074	694026101	617996625	732147973	1328230647		
	10053108	157908405	159975776	288666098	433984731	732613881	693610996	617522063	730567621	1329664835		
	9857607	157623149	159280127	287755629	432480043	730202073	691682507	615839185	728552094	1326508963		
	9865129	157797233	159197512	287806159	432429199	730199434	691918743	616037577	727940384	1329302066		
	10130553	158045342	159325302	287944626	432648180	730673708	692547588	616634213	728443029	1331351141		

MW - Areal%	>20 000	20 000 - 15 000	15 000 - 10 000	10 000 - 8 000	8 000 - 6 000	6 000 - 4 000	4 000 - 2 000	2 000 - 1 000	1 000 - 500	500 - 200	<200
0,2	0,3	1,0	1,1	2,4	5,4	14,2	16,3	14,1	15,7	29,2	
0,0	0,1	0,8	1,0	2,3	5,3	13,9	16,1	14,2	15,0	31,3	
0,4	0,4	1,1	1,1	2,4	5,5	14,3	16,2	14,0	15,6	29,0	
0,4	0,4	1,1	1,1	2,4	5,5	14,3	16,3	14,1	15,6	29,0	
0,2	0,3	1,0	1,1	2,4	5,5	14,5	16,5	14,1	15,6	28,8	
0,4	0,4	1,0	1,0	2,3	5,4	14,4	16,5	14,2	15,6	28,8	
0,5	0,4	1,1	1,1	2,4	5,4	14,0	16,1	14,1	15,8	29,1	
0,5	0,4	1,1	1,1	2,5	5,5	14,3	16,1	14,0	15,7	28,8	
0,5	0,4	1,1	1,1	2,4	5,4	14,2	16,2	14,1	15,8	28,9	
0,3	0,4	1,0	1,1	2,4	5,4	14,2	16,2	14,1	15,6	29,2	
	0,2	3,0	3,1	5,6	8,5	14,3	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	2,9	3,1	5,6	8,5	14,3	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,0	3,1	5,6	8,5	14,2	13,5	12,0	14,1	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,7	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,6	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	
	0,2	3,1	3,1	5,6	8,4	14,2	13,5	12,0	14,2	25,8	

